

20130703PA

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進 研究事業

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 鐔田 武志

平成26（2014）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発 ----- 1

鏑田 武志

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発

研究代表者 鰐田 武志 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研 究 要 旨

抗体産生増強活性の高い CD22 結合シアル酸誘導体を開発するために、すでに抗体産生増強活性が明らかになっているシアル酸誘導体 GSC-718 を合成展開して得られた約 20 の化合物から、より抗体産生増強活性の高い化合物を同定した。また、GSC-718 が B 細胞活性化を誘導するメカニズムの解明を行い、この化合物が B 細胞の緊張性シグナルを増強することにより活性化を増強することが強く示唆された。さらに、より優れたシアル酸誘導体の合理的設計を行なうために、組み換え CD22 タンパク質の大量発現系を改善し、シアル酸誘導体の CD22 結合部位の同定とコンフォメーションを明らかにした。

分担研究者：

石田秀治

岐阜大学応用生物科学部 教授

山口芳樹

理化学研究所 チームリーダー

伊藤暢聡

東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

A. 研 究 目 的

近年スプリットワクチンなど安全性の高いワクチンが希求されているが、安全なワクチンは免疫原性が低いために、適切な免疫増強剤（アジュバント）を併用し、免疫源性を高める必要がある。開発済みおよび開発中のアジュバントは基本的に自然免疫細胞を標的とする。その結果、樹状細胞の活性化により免疫応答を増強するが、マクロファージなどの自然免疫細胞

も活性化し、炎症性サイトカインの産生等を介して炎症を惹起して副反応を誘導する。このため、ヒト用ワクチンでは安全性の確認された限られたアジュバントを少量使用できるのみである。ワクチンによる感染防御は、ウイルスに対するものも含め、もっぱら抗体、とりわけ中和抗体により成立し、キラーT 細胞などの細胞性免疫の寄与は少ない（Edgill-Smith et al. Nature Medicine 2005 等）。したがって、安全で有効なワクチン開発には、自然免疫を標的とせずに抗体産生を担う B リンパ球（B 細胞）の活性化のみを増強するような、新規コンセプトによる免疫増強剤の開発が必要である。

CD22 は、もっぱら B 細胞に発現する膜分子で、Siglec2 とよばれる Siglec ファミリーの分子である。CD22 は細胞外のレクチンドメインで $\alpha 2,6$ シアル酸に特異的に結合する。また、細胞内には immunoreceptor tyrosine-based

inhibition motif (ITIM) があり、B 細胞抗原受容体シグナル伝達を負に制御し、B 細胞の活性化を抑制する。我々は CD22 欠損 B リンパ球で抗体産生が顕著に増強することを示した (Onodera et al. J. Immunol. 2008)。さらに我々は、マウスおよびヒト CD22 に天然リガンドの約 1 万倍の高親和性で特異的に結合するシアル酸誘導体 GSC-718 の合成に成功し (Abdu-Allah et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009)、この化合物が B 細胞の活性化を増強するという結果を得ている。CD22 はもっぱら B 細胞に発現するため、CD22 を制御することにより B 細胞の活性化を増強し、抗体産生を増強する優れた化合物を開発できれば、炎症を誘導しない画期的なアジュバントとなると期待される。

より活性の高いシアル酸誘導体を合成するため、本研究では GSC-718 の大量合成や種々の類縁体への拡張に向けた効率的な合成経路を確立し、この経路を用いて多様な GSC-718 類縁体化合物を合成し、次いで、合成展開で得られた化合物の活性を評価することにより、より活性の高い化合物を開発することを目的とする。また、GSC-718 が B 細胞を活性化するメカニズムの解明を行なった。さらに、活性の高いシアル酸誘導体の開発には CD22 の立体構造情報および阻害剤との相互作用に関する情報が必須であるので、CD22 のリガンド結合ドメインの X 線結晶解析に必要となる高純度かつ大量の試料を得る発現および精製方法の開発と、核磁気共鳴 (NMR) 法による CD22 と阻害剤との相互作用様式を明らかにすることを目的と

した。

B. 研 究 方 法

CD22Fc 融合タンパク質の産生

ヒトおよびマウス CD22 のリガンド結合領域を含む N 末端領域とヒト免疫グロブリン IgG の Fc 領域との融合タンパク (hCD22Fc および mCD22Fc) をコードする発現プラスミドを、糖鎖にシアル付加することのできないシアル酸トランスポーター変異チャイニーズハムスター細胞株である Lec2 細胞に導入して得られた安定発現細胞株 (Lec2-mCD22Fc, Lec2-hCD22Fc) を京都大学竹松弘准教授に供与を受けた。この細胞を 10%FCS (ニチレイ) と 50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA) を添加した α -MEM 培地 (ナカライ) で 2-3 日間培養した。次いで、50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA) 添加した Hybridoma-SFM Complete DPM (GIBCO) 無血清培地で 2 週間培養を行った。上清を回収した後に Protein G Sepharose TM 4 Fast Flow (GE) 充填カラムにかけ、カラムに結合したタンパク質を 0.1M クエン酸緩衝液 pH3.0 で溶出した。溶出したタンパクは PBS で透析した。

競合 ELISA によるシアル酸誘導体の CD22 への親和性の測定

GSC-660 は CD22 に IC₅₀ が数 μ M で結合するシアル酸誘導体である (Abdu-Allah et al. J. Med. Chem. 2008)。GSC-660 をビオチン化した化合物 GSC-731 を

合 成 し た (Abdu-Allah et al. Tetrahedron Lett. 2009)。ストレプトアビジン 2.5 μ g(ナカライ)を固層化した ELISA プレートに 4 μ g/ml の GSC-731 を加えて室温で 1 時間インキュベーションを行ない、洗浄後に、ブロッキングバッファー (1%BSA (ナカライ) 含有 PBS) を用い室温で 2 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、種々の濃度のシアル酸誘導体を hCD22Fc または mCD22Fc と混合した溶液を加え、2 時間室温インキュベーションし、洗浄後にブロッキング溶液で 1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (SBA) を加え室温で 1 時間インキュベーションを行った。洗浄後に、アルカリホスファターゼ 基 質 溶 液 (Phospatase substrate(SIGMA) を 0.1MNaCl/5mM MgCl₂/ 0.1M Tris-HCl, pH9.5 で溶解) を加えて発色させ、プレートリーダー (Molecular Devices)を用いて 405nm の吸光度を測定することにより、プレートに結合した CD22Fc を検出し、CD22Fc の GSC-731 への結合を 50%阻害するシアル酸誘導体の濃度を求めた(IC₅₀)。

フローサイトメトリーによるシアル酸誘導体の CD22 への親和性の測定

CD22 のナチュラルリガンド発現細胞株として、マウスミエローマ細胞株である J558L μ m3 に α 2,6 シアル酸転移酵素 ST6GalII 遺伝子を発現させたトランスフェクタントを用いた。この細胞 2 $\times$ 10⁵個/50 μ l を 1 μ g の CD22Fc と種々の濃度 (0.01-1000 μ M)のシアル酸誘導体とともに氷上で 30 分間インキュベーションを行

った。反応後、RPE 標識抗ヒト IgG 抗体 (Southern Biotech) を 0.5 μ l 加えて氷上に 20 分間静置し、細胞に結合した CD22Fc と反応させた。反応終了後、FACS Buffer (2% FCS 含有 PBS)にて 500 μ l とし、フローサイトメーター (CyAn, Dako) で蛍光強度を測定することにより細胞に結合し CD22Fc の量を測定し、細胞上の α 2,6 シアル酸への CD22Fc の反応を 50%阻害するシアル酸誘導体の濃度を求めた (IC₅₀)。

マウス B 細胞の精製

野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス) 脾細胞を溶血後、抗 CD4 抗体 (RL172.5), 抗 CD8 抗体(3.115), 抗 CD90 抗体(Thy1.2, Serptec)と氷上で 30 分間反応させ、洗浄後にウサギ補体 (Cedarlane) と 37°C で 30 分間インキュベーションすることにより T 細胞を除去した。次いで、Percoll(GE) 密度勾配遠心によりリンパ球分画を分取することにより精製 B 細胞を得た。

B 細胞増殖の測定

精製 B 細胞を PBS で 10⁶個/ml に調整した。2 μ M の carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes)とちもに 37°C で 10 分間インキュベーション後、氷上で 5 分間静置して標識した。洗浄後に 10 μ g/ml の抗マウス CD40 抗体 (FGK45) または 10nM の CpG オリゴ (ODN1668、北海道システムサイエンス) および 50 μ M のシアル酸誘導体とともに 10%FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノール(SIGMA)添加

RPMI1640 培地 (Wako)で 72 時間培養した。培養後の CFSE の蛍光をフローサイトメーター(CyAn, Dako)で解析し、分裂した細胞の割合を求めた。

細胞内カルシウムイオン濃度の測定

マウス脾臓より精製した B 細胞を、Ca²⁺ 蛍光指示薬である Fluo-4(Invitrogen) 5 μ g とともに 37°Cで 30 分間インキュベーションした。細胞を洗浄後、Fluo-4 の蛍光強度をフローサイトメーター(FACS Calibur)により測定した。測定開始 28 秒後に終濃度 50 μ M のシアル酸誘導体および終濃度 10 μ g/ml の抗マウス IgM 抗体(Jackson ImmunoResearch)を加え、3 分間蛍光強度を測定した。

アジュバント活性の評価

8 週令の野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス) に抗原として鶏卵アルブミン(OVA)をシアル酸誘導体と共に腹腔内投与し、2 週間後にマウスから採血した。血清中の OVA 特異的抗体価を測定するために、ELISA プレートに OVA を固層化し、ブロッキング溶液 (1%BSA を含む PBS) で室温で 2 時間ブロッキングしたのちに、ブロッキング溶液で希釈した血清サンプルを加え、室温で 2 時間インキュベーションした。その後に ELISA プレートを洗浄し、ブロッキング溶液で 1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を加え室温で 1 時間インキュベーションを行った。洗浄後に、アルカリホスファターゼ基質溶液を加え発色させ、プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 405nm の吸光度を測

定することにより、OVA 特異的 IgG の濃度を測定した。

骨髄細胞から樹状細胞の誘導

C57BL/6 マウス大腿骨、脛骨へ 10%FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA)添加 RPMI1640 培地を注入することにより骨髄細胞を採取した。細胞を溶血処理後 106 個/ml に調整し、200ng/ml の Flt3L (Peprotech)または 10ng/ml の GM-CSF(Peprotec)とともに 10%FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA)添加 RPMI1640 培地で 7 日間培養した。培養後に、上清を回収し、さらに PBS でプレートを洗浄して細胞を回収した。

フローサイトメトリーによる CD22 発現の測定

野生型 C57BL/6 および CD22 欠損マウス (Duke University Tedder 博士から供与) から、腹腔滲出細胞、骨髄細胞、脾細胞を単離し、以下の抗体で染色した。Alexa647 標識抗マウス CD22 抗体 (F239)、eFluor®450 標識抗マウス CD11c 抗体 (N418、eBioscience)、Alexa647 標識抗マウス F4/80 抗体 (BM8, Biolegend)、ビオチン標識抗マウス Gr-1 抗体 (RB6-8C5)、Pacific Blue 標識抗マウス CD45R 抗体 (B220, RA3-6B2)、Alexa647 標識抗マウス CD3 抗体 (145-2C11, BioLegend)、FITC 標識抗マウス CD19 抗体 (1D3, eBioscience)、PE 標識抗マウス NK1.1 抗体 (PK136, BD)、および PE 標識ストレプトアビジン (BioLegend)。骨髄由来樹状細胞は Alexa647 標識抗マウス CD22 抗体 (F239)

と抗マウス CD11c 抗体で染色した。マクロファージ (F4/80+CD11c+腹腔滲出細胞)、好中球 (Gr-1+骨髓細胞)、T 細胞 (B220-CD3+ 脾細胞)、B 細胞 (B220+CD3-)、および樹状細胞 (CD3-CD19-NK1.1-CD11c+ 脾細胞および CD11c+骨髓由来樹状細胞) の CD22 発現をフローサイトメーター(CyAn, Dako)で測定した。

骨髓由来樹状細胞の活性化

骨髓細胞から誘導した樹状細胞を、1nM の CpG(ODN1668)または 0.1μg/ml の LPS(*E.Coli* typeO111:B4, SIGMA)の存在下、10%FCS、50 μM 2-メルカプトエタノール(SIGMA)添加 RPMI1640 培地で 24 時間培養を行い、Alexa647 標識抗マウス CD80 抗体 (16-10A1, eBioscience)、FITC 標識抗 CD86 抗体(GL1, BD)、APC 標識抗 CD40 抗体(3/23, BD)、FITC 標識抗 I-A/I-E 抗体(2G9, BD)で染色し、フローサイトメーター(CyAn, Dako)で蛍光強度を測定した。

CD22 の大量発現系の構築と粗精製

タンパク質の結晶化には、非常に高純度の精製試料が大量に必要である。これを達成するため、大腸菌およびヒト培養細胞を用いた大量発現系の構築を行った。CD22 の細胞外ドメインは 7 回の繰り返しドメインより構成されているが、リガンド結合部位は一番 N 末端側のドメイン(ドメイン 1)に存在すると考えられている。発現させるドメイン構成があまり長すぎると発現にも結晶化にも不利と考えられるため、N 末端側のドメイン 1 から 3 までを発現系構築の

対象とした。

CD22 はドメイン内とドメイン間で複雑なジスルフィド結合をもち、特に大腸菌での発現系では正しいフォールディングが行われにくいと予想される。そこで、大腸菌による発現系では、細胞内で正しいジスルフィド結合を形成することを促進するタンパク質を融合させたタンパク質として発現させる方法を検討した。CD22 の N 末端側あるいは C 末端側に融合させ、それぞれ有効性を検証した。さらにこれらの発現コンストラクトに対して点変異を導入し、凝集を抑制させ収量を改善させる条件を検討した。並行して、非常に可溶性の高いタンパク質と CD22 を融合させ、あわせて数種の点変異を導入し発現量を大幅に上昇させる条件を検討した。

ヒト培養細胞を用いた大量発現系構築のため、CD22 のドメイン 1 から 3 までを含み、さらに C 末端側に Fc ドメインを融合させたものについて検討した。

大量発現させたタンパク質は、His タグを用いたアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどにより粗精製を行った。この時点で発現量と凝集体形成の有無を SDS-PAGE, Native-PAGE により確認した。

CD22 の精製と結晶化

大腸菌およびヒト培養細胞を用いた発現系にて一定以上の発現量を達成し、かつ凝集体の形成のないものについて、CD22 に融合させたタンパク質部分の切断をプロテアーゼにより行った。切断後の断片は、再度カラムクロマトグラフィーを行うことで除

去し、結晶化用精製試料とした。融合タンパク質部分を除去すると凝集体を形成してしまう場合は、融合タンパク質を残したまま結晶化用試料とした。

得られた結晶化試料について、市販の結晶化スクリーニングキットを用い結晶化条件を広範に探索した。

ヒトおよびマウス由来 CD22 のドメインの哺乳細胞による発現条件の検討

ヒトおよびマウス CD22 の細胞外ドメイン 1 およびドメイン 1-ドメイン 2 の遺伝子を pCM ベクター (pcDNA3.1 を改変したもの。目的タンパク質の C 末端側に TEV プロテアーゼ切断配列、His₆, myc tag, His₆ が付加される) に組み込み、HEK293S 細胞に導入した。シグナルシーケンスとして CD22 由来のシーケンス、およびベクターに含まれる Nigogen 由来のシーケンスを用いた。ベクターを導入して 3 日間培養し、培養上清 1 mL を Ni sepharose で精製し、SDS-PAGE を行った。タンパク質は抗 myc tag 抗体を用いた Western Blotting により検出した。また、組み換えタンパク質の N 型糖鎖の切断は PNGase F 処理により行い、PNGase F 処理による SDS-PAGE の移動度の変化から N 型糖鎖の存在を確認した。

溶液 NMR 測定

NMR の試料は 10 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl (pH 7.3), 100% D₂O に CD22-Fc を 10 μ M の濃度で溶解させた。NMR 測定は TXI cryogenic probe を装着した DRX-500 (BrukerBioSpin) を用いて 5°C にて行った。Saturation transfer difference

(STD)-NMR はシアル酸誘導体 (阻害剤 X もしくは阻害剤 Y) を 1 mM の濃度 (100 eq) で添加して実験を行った。タンパク質に由来するシグナルの照射は -2 ppm を照射し、コントロールとして 40 ppm を照射した。Transferred NOE (TR-NOE) の実験は 0.5 mM のシアル酸誘導体の濃度 (50 eq) で行った。シアル酸誘導体に由来するシグナルの帰属は主に 2D NOESY スペクトルの解析により行った。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会により承認されたもので、東京医科歯科大学動物実験規則に基づき適切に行なった。

C. 研 究 成 果

(1) CD22 阻害化合物の設計及び合成 GSC-718 の効率的合成法の開発

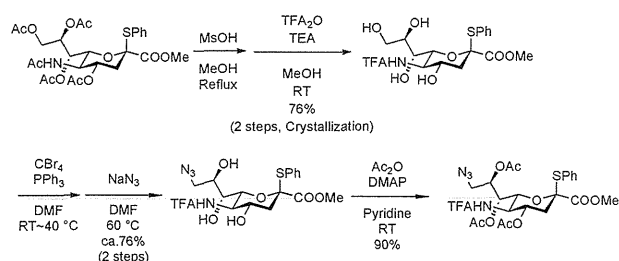
これまでの研究で、Siglec-2 に対して顕著な阻害活性を有するシアル酸誘導体 (GSC-718) を報告しているが、in vivo 試験に向けた大量合成や、より強力な阻害活性を有する化合物を得るための構造展開を行う上で、より効率的な合成法の確立が望まれていた。従来の合成経路における最大の問題点は、グリコシド化における精製の煩雑さであり、この合成経路で使用している *N*-BnGc ドナー (Neu5BnGc) を用いたグリコシド化反応では、目的物と副生成物の TLC 上での移動度の差が小さく、それがシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる

精製を困難にする原因となっていた。そこで、本研究では、シアル酸ドナーの構造を変換することで目的物と副生成物の分離を簡便にできないかと考えた。

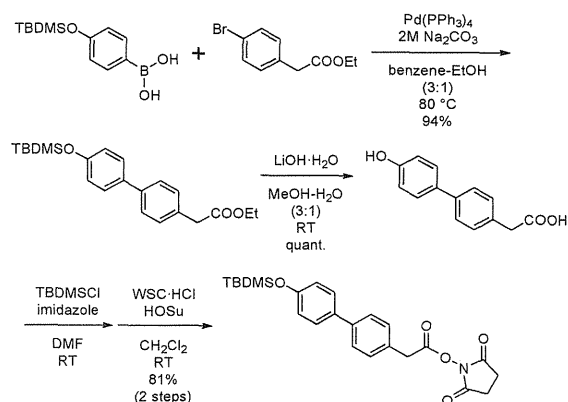
新規合成経路は、グリコシド化に *N*-TFA ドナー (Neu5TFA) を使用し、近年当研究室において開発された 1,5-ラクタム体を經由するというものである (Tanaka et al. Tetrahedron Lett. 2009)。Neu5TFA はグリコシド化における立体選択性及び反応性において *N*-Troc ドナーをも上回ることが知られている。しかし、生成した立体異性体の分割が困難である場合が多い。本研究では、グリコシド化後の反応混合物を 1,5-ラクタム化反応に供することでこれを改善することとした。1,5-ラクタム化は α -グリコシド特異的に反応が進行するため、グリコシド化後の反応混合物からの目的物の簡便な分離が可能になるという利点がある。これにより、従来最も時間のかかっていたグリコシド化の精製をより迅速に行い、より多くの類縁体合成を効率的に行えると考えた。

GSC-718 の効率的合成経路構築に向け、最初にシアル酸ドナーの合成を行った。出発物質としては *N*-Ac シアル酸を用い、Ar 雰囲気下、還流条件で MeOH 溶媒中、MsOH を作用させることで Ac 基を脱保護した化合物に対し、室温で MeOH 溶媒中 TFA₂O と TEA を作用させた。続いて、9 位水酸基を N₃ 基で置換する反応を行った。Ar 雰囲気下、室温で DMF に溶かし、40 °C で PPh₃ と CBr₄ を作用させることでまず 9 位の Br 化を行い、続いて NaN₃ を加え 60 °C で反応さ

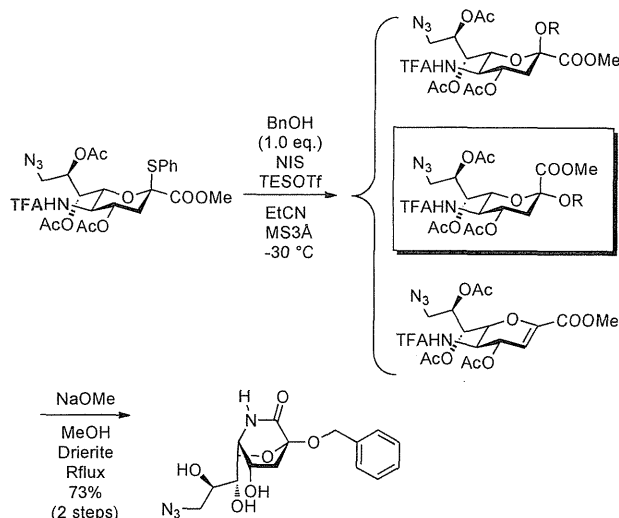
せることで 76% の収率にて目的化合物を得た。この化合物を Pyridine 溶媒中、室温で Ac₂O、DMAP を作用させることで収率 90% にて新規シアル酸ドナーを得ることができた。



得られた新規シアル酸ドナーをグリコシド化反応に供した。ドナーと BnOH (各 1.0 eq) を縮合プロモーターとして NIS (1.5 eq) と TESOTf (0.20 eq) を用いて、EtCN 中 -30 °C で活性化させたところ、目的化合物を収率 75% ($\alpha/\beta = 7/1$) で得る事が出来た。これは従来の Neu5Troc ドナーよりも高収率であり、触媒量の酸で反応を進めることができた。続いて、得られた反応混合物を 1,5-ラクタム化反応に供した。Ar 雰囲気下、反応混合物を MeOH に溶解し、乾燥剤として Drierite (ドナーの重量の 2 倍量) を加えて 1 時間攪拌後、28% NaOMe in MeOH (ドナーの 2.5 当量) を加え、還流条件下で 68 時間攪拌した。その結果、立体特異的に目的化合物のみ反応が進行した。副生成物を解析したところ、5 位の TFA 基が脱離したアミン遊離型の β -グリコシド及び 2,3-ene 体が確認された。この大幅な極性差を利用することで、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより容易に目的の α -グリコシドの単離が可能となった。

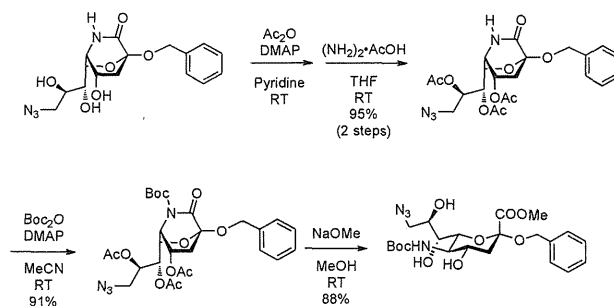


目的化合物の収率も73%と、ラクタム化反応自体もほぼ定量的に反応が進むことから、目的である迅速かつ高収率な類縁体合成に向けて非常に有用な結果を得ることができた。



最終的な目的化合物の合成に向け、シアロ酸のラクタム体を開環する必要があった。そこでラクタム体の窒素に Boc 基を導入し、その後 NaOMe を作用させることでラクタム体を開環する手法を採用した。まず、ラクタム体に Pyridine 溶媒中、室温で Ac₂O、DMAP を作用させることで Ac 化し、THF 溶媒中、室温で (NH₂)₂·AcOH を作用させることにより、目的化合物を 2 段階収

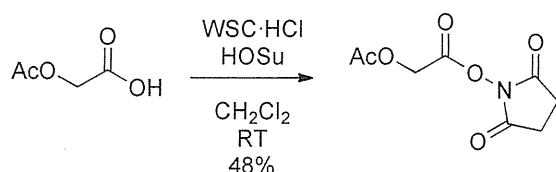
率 95% で得た。得られた化合物を MeCN に溶解し、Boc₂O と触媒量の DMAP を加えることで、収率 91% にて化合物を得た。続いて、この化合物を MeOH 溶媒中、NaOMe 28% in MeOH を作用させることでラクタム体の開環反応を試み、収率 88% にて目的の構造を得ることに成功した。このラクタム開環反応では、1 位のカルボン酸を開環と同時にメチルエステルとして保護することができるため、極性を保持することが可能であり、以降の反応に円滑に移行することも利点の一つである。どの反応も際立った副生成物は確認されず、合計 4 段階で総収率 76% と極めて高い収率でラクタム体を開環することに成功した。



その後、GSC-718 の骨格構造を得るために、9 位の修飾及び 5 位の変換を行った。まず始めにシアロ酸 9 位の修飾を行った。シアロシド THF/H₂O=10/1 に溶解し、PPh₃ を作用させることで N₃ 基の還元を行い、そこに合成した NHS-エステルを加えることで 2 段階収率 84% にて 9 位にビフェニルユニットを導入することに成功した。

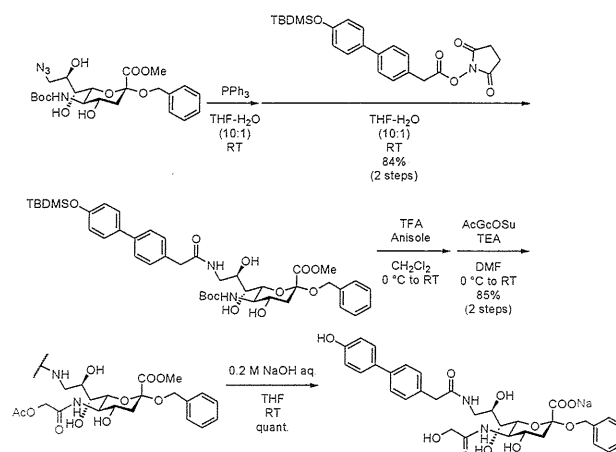
従来の合成経路では Troc 基が脱離した副生成物が確認される等、安定して高収率を

得ることが困難であったが、この反応系では主な副生成物は確認されず、容易に化合物を合成することが可能になった。続いて、5 位にグリコシル基を導入するために、5 位の Boc 基の除去及び、*N*-AcGc 化を行った。水酸基とアミンの反応性の差に注目し、アミンにのみ選択的に導入可能なスクシンイミド体を合成することにした。原料として AcGcOH を使用し、CH₂Cl₂ 溶媒中、WSC・HCl と HOSu を加えることで AcGcOSu の合成を目指した。



得られた AcGcOSu を用いて、5 位置換基の変換を行った。NHBoc 体を CH₂Cl₂ に溶かし、0 °C で Anisole と TFA を加え、室温で攪拌することで Boc 基の除去を行った。そして最後に、脱保護反応を行った。THF 溶媒中、0.2 M NaOH 水溶液を加えて室温で攪拌することで、純粋な最終化合物 (GSC-718) を定量的に得ることに成功した。尚、この反応では化合物の水溶性を高めるため、1 位のカルボン酸の Na 塩を維持する目的で中和処理を行わなかった。

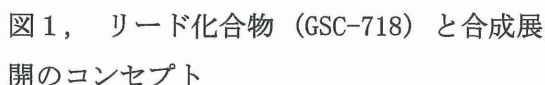
この新規合成経路では、総ステップ：15 ステップ、総収率：21% であり、従来の合成経路の総ステップ：10 ステップ、総収率 24% には劣るが、各ステップにおける精製の簡易化や危険で高価な試薬の改善など、「効率」という観点で評価すると、非



常に有用な合成経路を構築できたと考えている。

GSC-718 をモチーフとした構造展開

下図に示す様に、9 位の置換基については、これまでの構造-活性研究で最適化が達成されており、4-ヒドロキシビフェニル基に固定する。また 1 位カルボキシル基は活性発現に必須であり、保持する必要がある。残る 2 位 (アノメリック位)、4 位、5 位の 3 カ所のうち、本年度は 2 位と 5 位に着目し、合成展開を図る事とした (図 1)。2 位については、これまでの一次的な研究結果から、活性発現に大きく関わっている事が明らかにされており、置換基の立体的嵩高さや電子密度等を変化させた化合物を設計・合成し、最適化を図る事した。5 位の置換基については、マウスとヒトの CD22 の特異性を規定する程重要な構造的要素であるが、劇的な活性の増強を目指して、合成展開のポイントとして着目する事とした。



まずは、アグリコンの芳香環が Siglec-2 との親和性に影響を及ぼしているのかを確かめるため、アグリコンに環状アルキル基を導入した化合物の合成を目指した。そこで選択した置換基は、アダマンチルメチル基及びシクロヘキシルメチル基であった。この二つの構造は嵩高さに違いがあり、その親和性を比較することは、芳香族の有無だけでなく、物理的な立体障害による親和性の差の検証に繋がると考えたからである。

ロヘキシルメチル体の合成を行うこととした。

この化合物は従来経路（ドナーに Neu5Troc を用いた経路）にて一度合成を完了しているが、1 位のカルボン酸がプロトンフォームであったこと、化合物の活性を評価する際、合成条件を統一した方が結果に信頼性が出ること等の理由から再合成を行った。グリコシド化以外のステップでは何れも高収率で成功し、活性試験に必要な量の化合物の合成に成功した。

続いて、芳香環を維持しつつ、その電子的環境の変化がどのように Siglec-2 への親和性に影響を及ぼすかを検証することとした。種々の類縁体を合成し、各構造における親和性の相関を見ることで、更なる高親和性リガンド合成に向けたヒントを得ることが可能であると考えた。

本節では、アグリコンにモノフルオロベンジル基を導入した化合物の合成について述べる。フッ素は創薬の際に良く用いられる原子の一つで、その性質（原子の大きさが小さく水素の代替として使用可能、電気陰性度が高いため生体内のタンパクとの水素結合が強固になり親和性向上に繋がる）から非常に重宝されている。そこで本研究でも、芳香環上のフッ素の数及び位置が異なるものをアグリコンに持つ類縁体を合成し、その中で最適な構造を見出していこうと考えた。使用したモノフルオロベンジルは各芳香環の2, 3, 4 位にフッ素が導入されているものであり、3 種類の類縁体を合成した。まず、4-フルオロベンジル基を有する GSC-718 類縁体を GSC-718 とほぼ同じ収

率で合成することができた。特に際立って収率の悪い段階もなく化合物を合成することに成功した。続いて、2-フルオロベンジル基及び3-フルオロベンジル基を有する GSC-718 類縁体も、特に問題なく合成することができた。

続いて、芳香環の有するフッ素の数が異なる化合物も合成した。芳香環上の3,4位にフッ素を有するジフルオロベンジル型と4位に局在的に3つのフッ素を有するトリフルオロメチルベンジル型の二つである。この結果を先ほどのモノフルオロベンジル型と比較することで、フッ素数の違いが与え Siglec-2 親和性の影響を確認することを目的とした。3,4-ジフルオロベンジル基を有する GSC-718 類縁体合成は、GSC-718 とほぼ同程度の収率で合成することができた。特に精製し難い副生成物も生成せず、短期間で迅速に合成することができた。続いて、4-トリフルオロメチルベンジル基を有する GSC-718 類縁体も *N*-TFA 体が幾分生成したことが原因で5位置換基の変換の際に若干収率が低下した事を除けば、特に収率が悪い反応は見られなかった。

最後に、芳香環上の水素4つがフッ素に置換されたテトラフルオロベンジル基を有する GSC-718 類縁体の合成を達成した。

新規な類縁体として4-メトキシベンジル基を導入した化合物を合成した。メトキシ基は電子供与性を持つことから、これまで合成したフッ素型の化合物とは異なる物性を有する可能性が示唆され、この違いから生まれる新しい知見にも期待した。

さらに、アグリコンに芳香環上にメチル

基を有する官能基を導入した GSC-718 類縁体を合成した。このアグリコンを選択した理由としては、芳香環内の電子密度が高く、且つ合成しやすい化合物であるためであった。詳細は後に記載するが、Siglec-2 の阻害試験の結果より、前述した「4-メトキシベンジル基を有する GSC-718 類縁体」が GSC-718 の親和性を上回り、また芳香環上のフッ素の数が増加するほど親和性が低下するという結果が得られた。この結果から、芳香環内の電子密度が高いアグリコンほど親和性が向上することが示唆されていた。しかし、前述したように4-メトキシベンジル基を有する類縁体の合成は困難な部分も多く、現段階では創薬に向けた大量合成は難しいとも考えられた。そこで、その代替となる構造を見つけるべく上記の構造を選択し、合成することとした。この合成に関しては、経路全体を見ても概ね高収率で反応を行うことができた。

次に、アグリコンに3,4-ジメチルベンジル基を有する GSC-718 類縁体を合成した。一部収率が悪いステップがあったが、こちらも無事に目的化合物 126 を合成することができ、活性試験に供することになった。

種々の5位置換基を導入した GSC-718 類縁体化合物の合成

Mesch らの研究により、Siglec-2 に対して5位にノシル基が置換された化合物が親和性向上に繋がったという報告がされ (Mesch et al. ChemMedChem 2012)、5位置換基の重要性が示唆されていた。これまで、

当研究室では、5 位置換基に関しては主に天然型のグリコリル基を選択しており、十分に検討がされていなかった。そこで本研究にて、5 位置換基のスクリーニングを行い、より親和性の高いリガンドを合成することで、更に顕著な Siglec-2 阻害活性を有する化合物の発見を目指した。そして、これまでのアグリコン変換の結果と併用し、構造の最適化を図っていきたいと考えた。5 位置換基の変換を行う上で、アグリコンはベンジル基で固定することとした。これは、本研究が GSC-718 を基本として化合物スクリーニングしていることや、合成効率の良さなどを考慮した結果である。そして、5 位置換型のスクリーニングにて、まず 5 位遊離型類縁体を設計した。これは、ここまで選択してきた天然型のグライコリル基の活性を確認するために重要であり、これからのスクリーニングの基準になるとも考えたためであった。また、5 位置換基の変換は合成経路の終盤で変換可能なため、少ないステップで多くの類縁体を合成できる。目的化合物により合成ステップの多少の増減はあるが、基本的には迅速な合成が可能だ。

以下に示したように二段階にて目的化合物を合成することに成功した。しかし、収率は 28%と低く、あまり芳しい結果ではなかった。これは、強塩基による加水分解の際、一段階目の反応で Boc 基が除去されて遊離となったアミンが 1 位のカルボン酸と分子内で反応した結果、生成物の大半が 1, 5-ラクタム体になってしまったことが原因であった。しかし、5 位遊離型 GSC-718 類縁体は生物試験には十分量合成でき、また、生成した

1, 5-ラクタム体はアミンとカルボン酸両方が互いに結合したユニークな構造を有しており、この構造からも新たな知見を得る可能性もあると判断した結果、こちらも目的の構造と併せて活性試験に供することにした。

続いて、*N*-ベンジルグリコリル型の合成を行った。これは、これまで合成してきたグリコリル基の水酸基がベンジル基で保護された構造である。この構造を選択したのは、*N*-ノシル型の高親和性を受けて、5 位も芳香族が親和性に関与しているのではと考えたためである。そこで、これまでの構造から比較しやすく、且つ合成も容易なこの構造を選択することにした。

この化合物を合成するにあたり、最初に 5 位置換基導入試薬を調製し、それを用いて、目的物の合成を行った。以下に示すように、高収率かつ迅速に目的物を合成することができた。

続いて、ノシル基の特徴であるスルホンアミドに注目した合成について述べる。これは、*N*-ベンジルグライコリル型と並行して合成することで、ノシル基のどの要素が親和性の向上に影響を与えているのかを把握することが目的であった。そこで、スルホンアミドを有する中でも最も簡便な構造の置換基であるメシル基、そしてスルホンアミドよりもより強力な極性基である硫酸基を 5 位に導入した化合物を合成することとした。共通シアル酸構造を出発物質とし、従来の類縁体との物性の違いにより困難が生じたが、一つ一つのステップを精査し、検討することで目的物の安定供給が可

能な合成経路の構築ができた。

N-メシル型類縁体の合成後に *N*-硫酸型類縁体の合成を行った。スルホン系類縁体化合物を増やすとともに、硫酸基はスルホンアミド以上の極性基であり、脂溶性部位の多い GSC-718 の水溶性向上にも期待した。これは、これまで種々のアグリコンを導入した類縁体を合成した際、難水溶性を示す構造もあった経験から、*N*-硫酸型に生物活性があった場合はこれを導入することで難水溶性を改善し、その化合物構造本来の親和性を引き出すことが可能になると考えたためである。これまでシアル酸 5 位の硫酸化は報告が無く、他の *N*-硫酸化糖鎖の合成法を参考にして化合物の合成を行った。以下にその結果を報告する。

硫酸基のピリジン塩は非常に不安定で、空気と触れることにより容易に分解するため、二段階目の反応停止の際、TEA を過剰量加えることにより、硫酸基を一般的に安定とされている TEA 塩にすることとした。そして、特に処理をせず、反応溶液をそのままゲルろ過クロマトグラフィーにアプライすることで、迅速に試薬を除き、化合物が不安定になる要素を可能な限り排除しようと考えた。その結果、反応終了後のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製時にも分解は見られず、化合物の安定性を向上させることに成功した。反応もほぼ定量的に進行したため、高収率で目的物を得ることができ、合成法

を改善することができた。そして、得られた化合物はこれまで同様に加水分解反応に供し、定量的に反応を進めることができた。しかし、処理後の化合物を NMR で確認したところ、硫酸基の一部が TEA 塩の状態で残存しており、Na 塩と混在していることがわかった。これまでの研究もカルボン酸のフォームの違いが活性に影響を与えてきたことが明らかにされており、化合物にもう一度 0.5 M NaOH 水溶液を加えることで、過剰の Na 存在下に置き、TEA を完全に Na に置換し、化合物の大半を Na 塩にすることに成功した。

(2) CD22 結合化合物の活性評価とメカニズムの解明

合成展開したシアル酸誘導体の CD22 への親和性の測定

上記のようにして GSC718 を合成展開

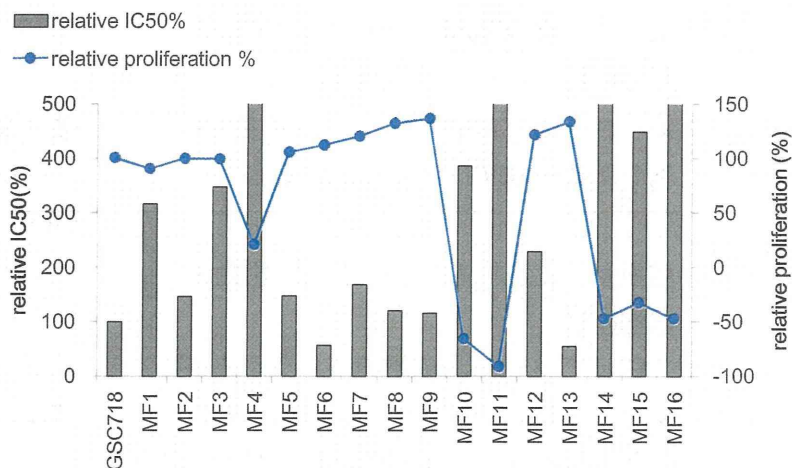


図 2, 各種化合物の CD22 への親和性および B 細胞増殖促進効果の測定

GSC718 を 100% とした場合の各化合物の CD22 親和性 IC50 (%), B 細胞増殖活性 (%)。

して作成した 16 化合物 (MF1~MF16)の CD22 への親和性を競合 ELISA 法により測定した。その結果、MF6, MF13 の 2 つの化合物では、GSC718 の IC50 を 100% とした場合の IC50 がそれぞれ 56.9%, 54.9% であり、CD22 への親和性が GSC718 よりも高いシアル酸誘導体であることが示された(図 2)。MF6 と MF13 は構造的に共通点を持った化合物であった。

合成展開したシアル酸誘導体の B 細胞活性化活性

精製したマウス脾臓 B 細胞を細胞分裂の指標として広く用いられている CFSE でラベルした後に、合成展開した化合物と抗 CD40 抗体または CpG オリゴとともに 72 時間培養し、B 細胞の増殖を CFSE の蛍光強度によって解析した。GSC-718 よりも 4 倍程度以上親和性が低い化合物 MF4, 10, 11, 14, 15, 16 (IC50 が 1 μ M 以上) では B 細胞増殖活性化が顕著に低下していた (図 2)。一方、GSC-718 よりも親和性の高い MF6 および MF13 の B 細胞の増殖は GSC718 と同程度であった。

代謝安定化をめざしたシアル酸誘導体の活性評価

GSC-718 から合成展開により代謝安定化をめざした化合物 W の活性評価を行った。化合物 W による組み換え CD22 タンパク質と細胞上のナチュラルリガンドの反応阻害をフローサイトメトリーで測定した。その結果 X の IC50 は GSC718 の約 1.5 倍で、ほぼ同じであることが明らかとなった。さらに、マウス脾臓 B 細胞

を W と抗 CD40 抗体または CpG オリゴで刺激したところ、GSC718 同様の、強い B 細胞の増殖が見られた。次に、W または GSC718 と OVA をマウスの腹腔内に投与して、血清中の特異抗体産生を測定したところ、GSC718 に比べて有意に強い特異抗体産生を認めた。これらの結果から、GSC718 よりもアジュバント活性の高いシアル酸誘導体を合成することに成功した。

種々の免疫細胞での CD22 の発現

マウス脾臓および腹腔内滲出細胞、骨髓細胞から細胞を単離し、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球のマーカーである、B220, CD19, , CD3, CD11c, F4/80, Gr-1 とともに CD22 を染色し、これら種々の免疫細胞での CD22 の発現をフローサイトメーターで測定した。T 細胞、マクロファージおよび好中球では全く CD22 の発現は認めなかったが、B 細胞の他に樹状細胞では CD22 の発現を認めた。

樹状細胞への GSC718 の作用

マウス骨髓細胞を GM-CSF または Flt3L とともに培養することにより cDC と pDC を誘導したところ、分化後の細胞には共に CD22 の発現があり、とりわけ cDC で CD22 の発現が高かった(cDC: 57.1%, pDC: 22.8%)。そこで、cDC および pDC を 50 μ M の GSC718 とともに培養した。脾臓 B 細胞は、GSC718 とともに培養すると有意に CD80 や CD86, MHCII の発現が増強した。また、GSC718 とともに代表的な TLR リガンドである CpG オリゴや LPS を培養に添加すると、

CpG オリゴや LPS 単独に比べて GSC718 添加により CD80, CD86, MHCII の発現が増強した。しかしながら、分化誘導した樹状細胞に GSC718 を加えても CD80, CD86, MHCII の発現は増強しなかった。また、LPS や CpG オリゴとともに GSC718 を加えても、これらの作用以上に活性化マーカーの発現増強は認めなかった。以上の結果から、樹状細胞も CD22 を発現するが、GSC718 は樹状細胞の活性化を増強しないことが明らかとなった。

CD22 のシグナル制御機能への GSC718 の作用

CD22 は B 細胞抗原受容体 (B cell receptor: BCR) のシグナル伝達を抑制することが知られている。そこで、CD22 のシグナル抑制機能への GSC718 の作用を明らかにするために、GSC718 の存在下で野生型 C57BL/6 マウス B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激して BCR を架橋し、カルシウムイオン流入を測定した。その結果、GSC718 が BCR 架橋によるカルシウムシグナルが低下させることが明らかとなった。CD22 欠損マウス由来の B 細胞では、カルシウムシグナルは野生型マウス B 細胞に比べ増強していたが、GSC718 添加によってもカルシウムシグナルは変化しなかった。この結果から、GSC718 は CD22 に依存して BCR シグナル伝達を負に制御することが明らかになった。

一方、GSC718 の添加のみにより細胞内カルシウムイオン濃度が軽度ではあるが増加した。しかし、このような GSC718 によるカルシウムイオン濃度の上昇は CD22 欠損マウスでは認めなかった。BCR

は抗原の非存在下でも構成的に弱いシグナルを伝達していることが示されており、このシグナル伝達は緊張性シグナル伝達 (tonic signal) と呼ばれている。GSC-718 は CD22 依存的に緊張性シグナル伝達を増強することが明らかとなった。

(3) 組み換え CD22 タンパク質発現系の構築と結晶化の試み

CD22 の大量発現系の構築

大腸菌を用い、ジスルフィド結合形成促進タンパク質を融合させた発現系について、CD22 のドメイン 1 のみ、ドメイン 1 と 2、およびドメイン 1 から 3 までの 3 種類を検討した。ドメイン 1 から 3 までを発現させた場合は発現量が少なく、また粗精製の結果、可溶性の凝集体を形成していた。ジスルフィド結合形成促進タンパク質を N 末端側、C 末端側いずれに融合させても同様の結果となり、結晶化には不向きと判断した。

N 末端側にジスルフィド結合形成促進タンパク質融合させ、ドメイン 1 のみ、あるいはドメイン 1 と 2 を発現させた場合、ドメイン間のジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたものについて、発現量が比較的多く、また粗精製後に一定量の単量体成分が確認できた (図 3)。

大腸菌を用い、高可溶性のタンパク質 (タグタンパク質) と CD22 を融合させた発現系では、タグタンパク質の分子量が比較的小さいものと、大きなもの 2 種について検討した。分子量の小さなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、いずれも発現量が非常に少なく、かつ可溶性の凝集体を形成していた。

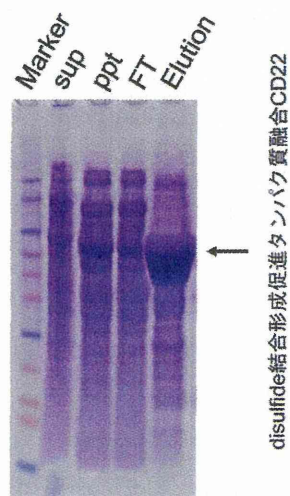


図 3, ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合 CD22 ドメイン 1 の SDS-PAGE
N末端側にジスルフィド結合形成促進タンパク質を融合させ、ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステインのみを Ser に変異させたもの。

大腸菌を用い、高可溶性のタンパク質(タグタンパク質)と CD22 を融合させた発現系では、タグタンパク質の分子量が比較的小さいものと、大きなもの 2 種について検討した。分子量の小さなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、いずれも発現量が非常に少なく、かつ可溶性の凝集体を形成していた。

分子量の大きなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、発現量が著しく多かった。特にドメイン 1 のみを発現させ、さらにドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたものについては、粗精製後に多量の単量体成分が確認できた。同様に、ドメイン 1 のみを発現させ、すべてのシステイン

残基をセリンに変異させたものについても、粗精製後に多量の単量体成分が確認できた。(図 4)。

ヒト培養細胞を用いた発現系を用い、CD22 のドメイン 1 から 3 までの C 末端側に Fc ドメインを融合させたタンパク質を発現させたところ、比較的少量の発現が確認できたが、非還元条件での SDS-PAGE の結果から、可溶性の凝集体を形成している可能性が高いと思われた (図 5)。

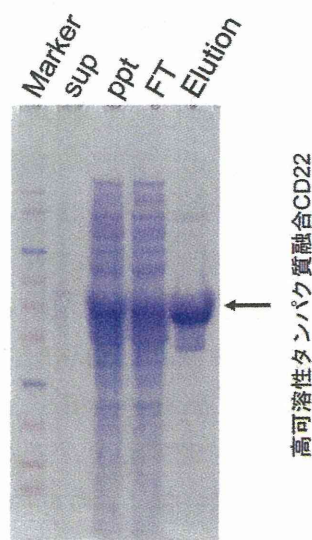


図 4, 高可溶性タンパク質融合 CD22 ドメイン 1 の SDS-PAGE
N末端側に高可溶性タンパク質を融合させ、すべてのシステイン残基をセリンに変異させたもの。

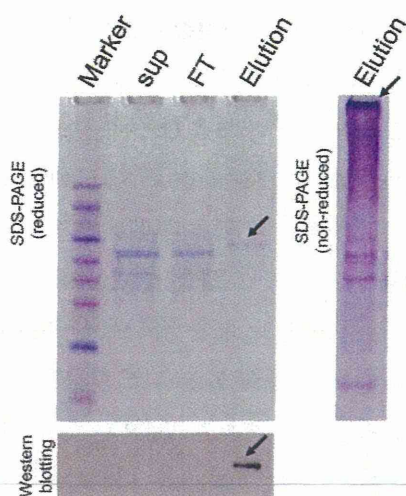


図 5, ヒト培養細胞発現系による
Fc 融合 CD22 の PAGE
黒矢印が, Fc 融合 CD22 に相当するバンド.

CD22 の精製と結晶化

ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合 CD22 についてさらなる精製を行い, ドメイン 1 のみを発現させたものに関しては, ジスルフィド結合形成促進タンパク質部分をプロテアーゼで切断, 除去した標品として回収可能であった. しかしながら, 結晶化実験に十分な収量を達成することが困難であった. またドメイン 1 と 2 を発現させたものについては, ジスルフィド結合形成促進タンパク質部分を切断すると可溶性の凝集体を形成してしまったことから, ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合型のまま精製し, 最終精製標品とした (図 6).

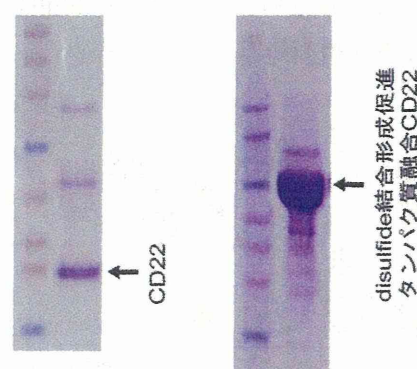


図 6, ジスルフィド結合形成促進タンパク質を用いた発現系による最終標品

高可溶性タグタンパク質融合 CD22 について, ドメイン 1 のみを発現させ, ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたもの, またすべてのシステイン残基をセリンに変異させたものの 2 種を粗精製後さらに精製した. 夾雑タンパク質の混入は低く抑えられたものの, ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基だけをセリンに変異させたものに関しては, 自身のドメイン内ジスルフィド結合に関与するシステイン残基に起因すると考えられる多量体成分が含まれていた. これは TCEP などの還元剤存在下では単量体に解離するため, 還元剤存在下で結晶化することとした. また, タグタンパク質をプロテアーゼにより切断, 除去した標品も量は少ないものの, 結晶化実験を行うことが可能な量を回収することが出来た.

すべてのシステイン残基をセリンに変異させたものについて, タグタンパク質をプロテアーゼにより切断すると CD22 部位が

不安定になったため、タグタンパク質融合型のまま最終精製標品とした (図7)。

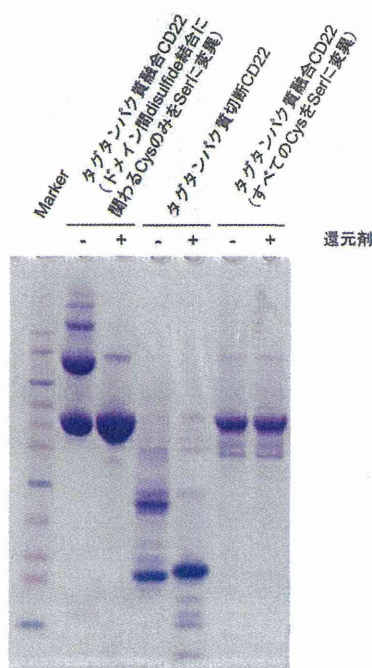


図7, 高可溶性タグタンパク質を用いた発現系による最終標品

以上のすべての最終標品について、結晶化条件の探索を広範囲に行ったが、高可溶性タグタンパク質融合 CD22 においてアモルファス状の凝集体が得られたものの、構造解析が可能な結晶は得られていない。

(4) NMR を用いた CD22 とシアル酸誘導体の相互作用の解析

ヒトおよびマウス由来 CD22 のドメインの哺乳細胞による発現条件の検討

ヒトおよびマウス由来CD22のドメインをHEK293S哺乳動物細胞で大量に発現するた

めの条件検討を行った。CD22の生物種(ヒトおよびマウス)、シグナルシーケンス(CD22に由来するシーケンスおよびベクターに含まれるNigogen由来のシーケンス)、CD22のドメイン(ドメイン1およびドメイン1-2)について検討した。その結果、CD22に由来するシグナルシーケンスを用いて、human CD22のドメイン1-2を組み込んだ系のみ、発現を確認することができた(図8)。また、そのタンパク質につき、PNGase F消化を行ったところ、有意に電気泳動の移動度が変化した。これらの結果より、哺乳細胞での発現ではシグナルシーケンスや発現領域は発現量に大きく影響を与えることが判明した。またhCD22のドメイン1-2ではN型糖鎖修飾が確認された。

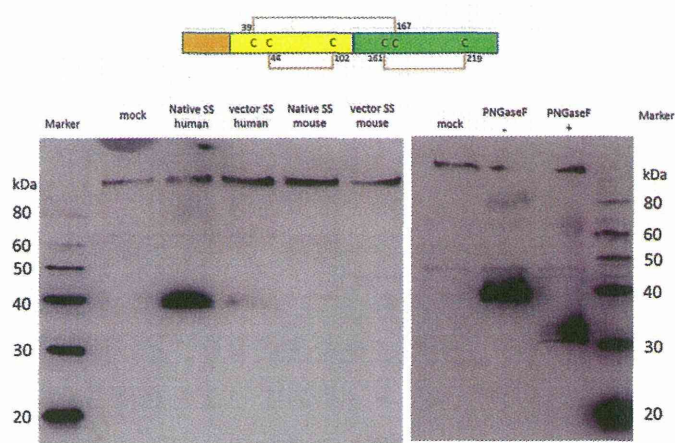


図8, CD22 ドメイン1-2のHEK293Sによる発現検討

CD22-Fc と阻害剤との相互作用解析: STD-NMR

STD-NMR 法ではタンパク質に結合するリガンドのエピトープ(蛋白質により認識される面)を同定する方法である(図9)。